

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-170971
(43)Date of publication of application : 11.07.1995

(51)Int.Cl. C12M 3/00
C12M 1/00

(21)Application number : 05-321535 (71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD
(22)Date of filing : 21.12.1993 (72)Inventor : KAMEI AKIHITO
SUGIHARA HIROKAZU
KOBAYASHI YASUSHI
MITSUMATA TADAYASU

(54) BASE SUBSTRATE FOR TISSUE SLICE CULTURE

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare a base plate for a tissue slice culture whose adhesion to the tissue slice is high and the slice can readily be placed in the interface between the solid and liquid phases.

CONSTITUTION: Quartz glass is spin-coated with a negative-photosensitive polyimide (NPI) in 1 μ m thickness to prepare an insulating base, then a collagen gel layer is formed thereon in a thickness of 10 μ m to 300 μ m. Since the tissue slice is cultured in an environment close to that in vivo, the anchoring behavior of the slice to the base plate is improved.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.02.1999
[Date of sending the examiner's decision of rejection] 13.03.2001
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-170971

(43) 公開日 平成7年(1995)7月11日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 3/00	Z			
1/00	Z			

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平5-321535	(71) 出願人	000005821 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
(22) 出願日	平成5年(1993)12月21日	(72) 発明者	亀井 明仁 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
		(72) 発明者	杉原 宏和 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
		(72) 発明者	小林 康 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 池内 寛幸 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織切片培養用基盤

(57) 【要約】

【目的】 組織切片の接着性が高く、組織切片を液相と気相の界面に容易におくことが可能な組織切片培養用基盤を得る。

【構成】 石英ガラスに1 μ m厚のネガティブフォトリソグラフィ用ポリイミド (N P I) をスピンコートした絶縁基盤と、その上に設けられた厚さ10 μ m以上300 μ m以下のコーゲンゲル層からなる。組織切片をより生体内の環境に近い状態で培養することができ、組織切片の基盤上への定着性に優れた組織培養用基盤となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 絶縁基盤とその上に設けられたコラーゲンゲル層からなる組織切片培養用基盤。

【請求項 2】 コラーゲンゲル層の厚さが 10 μm 以上 300 μm 以下の範囲である請求項 1 に記載の組織切片培養用基盤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、基礎医学の分野で用いられる生体組織切片の培養用基盤に関するものである。 10

【0002】

【従来の技術】 生体組織切片の培養（以下、組織切片培養と略す。）は、細胞を解離し、分散させて培養する解離細胞培養法と異なり、生体における構造を保持したまま組織を切片状にして取り出し、培養する方法である。組織切片培養は、解離細胞培養法に比べ、生体内における各細胞の働き、細胞間の相互作用および細胞集団としての機能等をより忠実に再現できる。そのため、組織切片培養は基礎医学の分野で重要な方法である。

【0003】 組織切片の培養において鍵となる点は、組織切片への酸素の供給であり、従来の方法もこの点に工夫を持っている。従来の組織切片培養の代表的な方法には、ゲブラーらによる回転培養法（ジャーナル オブ ニューロサイエンス メソッズ 4（1981年）第 3 29 頁から第 3 42 頁、J. Neurosci. Methods, 4(1981), pp. 329-342) および山本らによる手法（サイエンス 245（1989年）第 192 頁から第 194 頁、Science 245(1989), pp. 192-194) がある。 20

【0004】 前記回転培養法は、基盤上に定着させた組織切片を、蓋付の試験管に入れ、組織切片が浸る程度に培養液を加え、試験管を回転させ、培養液を組織切片の表面に循環させる。この培養液の循環には、組織切片を間欠的に外気と接触させ、組織への酸素の供給を助ける効果、および壊死した細胞を洗い流す効果がある。その結果、組織切片中の細胞への酸素の供給および培養液中の栄養素の供給が容易となり、組織切片の最高 3 週間程度におよぶ長期培養が可能であった。 30

【0005】 山本らによる手法は、培養液を入れた容器の上面に、気相と液相の界面に位置するように、細胞が通らない程度の大きさの孔を有する膜を配置し、この膜上に組織切片を静置し、培養する方法である。この培養法でも、回転培養法と同様、培養が進むにつれて組織切片は扁平に伸び、組織切片中の細胞の酸素の取り込み、および培養液中の栄養素の取り込みが更に容易になり、最高 3 週間程度の長期培養が可能であった。 40

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 生体の組織切片を培養する目的において、上記 2 方法は優れた方法であるが、培養に際してそれぞれ通常の培養用器具以外に、試験管を回転させる装置、微小孔膜を用意しなければならない 50

という課題があった。

【0007】 また、培養組織切片を用いて、生体内における各細胞の働き、細胞間の相互作用および細胞集団としての機能等を調べるためには、組織切片を観察し、切片中の細胞の働きを記録する必要がある。例えば、神経系の組織切片では、細胞間の神経結合を観察し、細胞の電気活動を記録する必要がある。細胞および細胞集団の活動には、偶発的、非可逆的な要素も含まれているため、観察および記録は、連続的に行うことが望ましい。しかしながら回転培養法においては、組織切片は常に、回転させられているため、培養初期から、培養中に連続的な記録観察を行うことは、困難であるという課題があった。一方、山本らによる手法は、培養される組織切片は静置されているため、組織切片の観察は容易であり、組織切片の連続的観察に適したものであった。

【0008】 近年、神経系の細胞のように、電気的活動を行う細胞の活動連続的に測定、記録することを可能とする一体化複合電極（特願平 4-236998、特願平 5-90291）が杉原らにより提案された。これらは、絶縁基盤上に金属電極を配置した構造を持ち、この電極を細胞に接触させ、細胞の電気活動に付随する細胞外近傍のイオン流によって生じる電位変化を記録する。この一体化複合電極を用いた細胞の電気活動の測定、記録法は、非侵襲的に行われるため、長期にわたる細胞の電気活動の測定、記録が可能である。

【0009】 この一体化複合電極と、山本らによる手法を組み合わせれば、電気的活動を行う細胞の連続観察およびその電気活動の連続記録が可能となるが、上記のように、一体化複合電極は、細胞の電気活動に付随する細胞外近傍のイオンの流れによって生じる電位差を記録するため、細胞の電気活動を記録するためには、細胞により密接に位置する必要がある。このためには、組織切片を絶縁基盤上に直接接着させて培養できることが望ましいが、山本らによる組織切片の培養手法では、組織切片を膜によって、液相と気相の界面に位置させるために、組織下部に液相を必要とする。そのため、絶縁基盤上への密着性を保つことが困難であるという課題があった。また、膜自体も絶縁基盤に対して接着性を持っていないために、組織切片の電極に対する密着性を保つことが困難であった。本発明は前記課題を解決するため、培養液の調整が容易で、組織切片を基盤上へ容易に定着でき、組織をより生体内の環境に近い状態、すなわち最適な環境で培養できる組織培養用基盤を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】 前記目的を達成するため、本発明の組織切片培養用基盤は、絶縁基盤とその上に設けられたコラーゲンゲル層からなるものである。

【0011】 前記組織切片培養用基盤の構成においては、コラーゲンゲル層の厚さが 10 μm 以上 300 μm

以下の範囲であることが好ましい。

【0012】

【作用】前記本発明の構成によれば、絶縁基盤とその上に設けられたコラーゲンゲル層からなる組織培養用基盤であることにより、組織切片の培養に最適な環境を提供できる組織培養用基盤を達成できる。すなわち、コラーゲンゲル層はコラーゲン線維が網目状に入り組んだ構造を持ち、その網目の内部に、培養液は蓄えられる。また、構成される網目構造は微細であるため、毛細管現象により、コラーゲンゲルの乾燥部分に絶えず培養液が供給される。従って、組織切片を培養した際の組織の乾燥を防がれる。また、組織切片培養の際の、組織切片を気相と液相の界面に位置させるという培養条件実現のための培養液の調整が容易である。さらに、コラーゲンゲル層の厚みを調節すれば、組織切片を絶縁基盤上に密接に位置させることが可能となる。また、コラーゲンは生体内の細胞外基質の構成要素であり、多くの組織の細胞に対して、培養時の基質への定着および細胞の伸展を促進する効果を有するので、本発明の組織培養用基盤上で組織切片を培養した場合、組織切片を基盤上へ容易に定着させることができる。また、組織切片をより生体内の環境に近い状態で培養することができる。

【0013】また、コラーゲンゲル層の厚さが $10\mu\text{m}$ 以上 $300\mu\text{m}$ 以下の範囲であるという本発明の好ましい構成によれば、良好な電気記録が可能な組織培養用基盤を達成できる。

【0014】

【実施例】本実施例の組織培養用基盤のコラーゲンゲル層の作製には、ブタの皮膚または、より一般的には、ラットの尾腱を酢酸等の弱酸で処理することにより得られる酸性コラーゲン溶液を用いる。同様の方法を用いて製造された市販品を用いても良い。コラーゲンゲル層の厚さは、 $10\sim 300\mu\text{m}$ が好ましく、さらに好ましくは $30\sim 150\mu\text{m}$ である。 $300\mu\text{m}$ より厚いと、組織切片が電極から離れ過ぎるので、良好な電気記録ができない。

【0015】絶縁基盤材料としては、組織切片培養後に顕微鏡観察出来ることが好ましいため透明な基盤が好ましく、石英ガラス、鉛ガラス、ホウ珪酸ガラス等のガラス、もしくは石英等の無機物質、または、ポリメタクリル酸メチルまたはその共重合体、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリプロピレン、尿素樹脂、メラミン樹脂などの透明性を有する有機物質等が挙げられるが、機械的強度と透明性を加味すると無機物質が好ましい。

【0016】以下、実施例を用いて本発明を具体的に説明する。(実施例1)

(中性コラーゲン溶液の調製)

1. 切断したラットの尾を、70%エタノール中に5分程度漬けた。

【0017】以下の操作は、低温(4℃)、滅菌環境下で行い、試料中に粉塵等が混入しないように注意した。

2. 滅菌したラットの尾から尾腱を取り出した。

3. 約1匹分のラットの尾腱に対して、10mlの0.5M酢酸、0.14M塩化ナトリウム溶液を加え、静かに攪拌し、コラーゲンを抽出した。

4. 不要成分をろ過および超遠心(50,000gで2時間)で除いた。

5. 調製したコラーゲン溶液を濃縮し、濃度を3mg/ml程度にした(4℃で使用時まで静置)。

6. 上記調製した酸性コラーゲン溶液に、0.1Nの水酸化ナトリウム溶液にフェノールレッドを加えた溶液(4℃)を徐々に加え、フェノールレッドの色変化を指標とし、コラーゲン溶液のpHを7.4にし、0.14M塩化ナトリウム溶液(pH7.4, 4℃)でタンパク濃度が2.4mg/mlになるように希釈した(4℃で使用時まで静置)。

【0018】上記のように調製した中性コラーゲン溶液は、室温下で5分から10分程度でゲル化する。以下にこの中性コラーゲン溶液を用いて、絶縁基盤上に、コラーゲンゲル層を作製する方法を記載する。基盤材料としては、機械的強度の強い透明な絶縁素材として、 $50\times 50\times 1\text{mm}$ の硬質ガラス(“IWAKI CODE 7740 GLASS”[岩城硝子(株)製]以下同じ)表面に、絶縁層としてネガティブフォトセンシティブポリイミド(NPI)を、乾燥後の厚みが $1\mu\text{m}$ となるようにスピンコートしたものをを用いた。絶縁層の厚みは、絶縁性が付与できる程度であればよく、特に限定するものではないが、通常 $0.1\sim 10\mu\text{m}$ が好ましく、 $1\sim 5\mu\text{m}$ が特に好ましい。

(コラーゲンゲル層の構成)

1. まず、用意した絶縁基盤の表面を、杉原らにより記載されたプラズマ処理法(特願平5-90292)で7分程度処理した。この処理により、絶縁基盤表面に親水性をもたせ、コラーゲンゲル層の絶縁基盤上への定着をよくする。

2. 続いて、絶縁基盤を滅菌した蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させた。

3. 乾燥した絶縁基盤を、4℃で冷却した。本操作は、コラーゲンの急速なゲル化を防ぐ目的を持っており、一様で薄いコラーゲンゲル層を作るためには重要な操作である。

4. 冷却した絶縁基盤上に、上記中性コラーゲン溶液を滴下し、絶縁基盤を傾けて溶液をコラーゲンゲル層を形成させる目的の範囲に行き渡らせた。

5. 絶縁基盤を45度傾けても液だれが起きない程度まで、余分な溶液を除いた。

6. 絶縁基盤のコラーゲン溶液塗布面を上にして、室温で10分程度静置し、溶液をゲル化させた。

7. 静置後、絶縁基盤のコラーゲンゲル層(約 $50\mu\text{m}$

厚)を形成させた部分を滅菌した蒸留水で洗浄し、塩およびフェノールレッドを除いた。

【0019】以上の方法により、組織培養用基盤を得た。なお、絶縁基盤をより確実にコートするために3から7の操作を、同じ絶縁基盤に対して再度繰り返してもよい。

(実施例2)次に、絶縁基盤上にコラーゲン層を形成させた組織培養用基盤上での組織切片の培養について述べる。以下の操作は、滅菌条件下で行った。実施例1で作製した組織培養用基盤上で、組織切片としてラットの

【0020】まず、実際に培養を始める前に、以下に示す準備を行う。

(イ)組織培養用基盤の中心部に、直径25mm、高さ6mmのプラスチック製円筒を接着し、細胞培養用ウェルを作製した。

(ロ)上記培養用ウェルを作製した組織培養用基盤を、直径10cmの滅菌シャーレに入れた。

(ハ)上記のように準備した後、培養用ウェルに培養用培地(ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)とハムF-12培地を1対1の体積比で混合したDMEM/F-12混合培地中にトランスフェリンを100μg/ml、インスリンを5μg/ml、D-グルコースを6mg/ml、プロジェステロンを20nM、ハイドロコルチゾン(コルチゾン)を20nM、ブトレンを100μM、亜セレン酸ナトリウムを5.2ng/mlの濃度になるように加えた培地。以下、単に培地と略す。)を500μlを加え、CO₂インキュベータ内(O₂濃度95%、CO₂濃度5%、湿度97%、温度37℃)で暖めた。この操作により、乾燥したコラーゲン層中に培地を浸潤させた。

【0021】以下、ラット大脳皮質切片の培養法について述べる。

(1)生後2日目のSDラットから、脳を取り出し、氷冷した0.25%D-グルコース入りハンクス平衡塩液(以下、HBSSと略す)に浸した。

(2)氷冷した0.25%D-グルコース入りHBSS中で、脳に付着している脳膜を、大脳皮質を傷つけないように注意しながら、先の鋭利なピンセットを用いて除いた。

(3)脳膜を除いた大脳皮質の片側の脳梁から500μm程度のところを、眼科手術用の微小ハサミを用いて、脳梁にそって後頭葉側から前頭葉側に向かって切断した。

(4)続いて、先の切断面に垂直に眼科手術用微小ハサミを入れ、200μmから300μm程度の厚さで大脳皮質を切断し、切片を作った。

(5)次に、切片の皮質につながっているもう一端を、眼科手術用微小ハサミを用いて切断し、切片を大脳皮質から切り離した。

(6)切り離した切片の幅を、眼科手術用の微小ハサミを用いて1.5mm程度に調整した。

(7)調整時に切断した組織片が混入しないように注意し、調整した大脳皮質切片を、口の大きなピペットで、傷つけないように静かにとり、培地の入った滅菌シャーレ中に移した。

(8)上記(ハ)の様に用意しておいた組織培養用基盤を、CO₂インキュベータから取り出し、組織培養用基盤の培養用ウェル中に、上記(7)の大脳皮質切片を口の大きなピペットで、傷つけないように静かに移した。

(9)バーナーであぶり先端をなめらかにしたパストゥールピペットの先端を利用したり、ピペットからの培地の噴射を利用して、大脳皮質切片を皮質の層構造が上面を向くように基盤上に導いた。切片を傷つけないように注意する。

(10)皮質切片を基盤上にのせた後、培地の量を調整し、皮質切片の底面が培地に触れ、上面が外気に触れた状態にした。

(11)調整後、組織培養用基盤を入れた滅菌シャーレに、培地の乾燥を防ぐために、あらかじめ37℃に暖めておいた滅菌水を15ml程度加え、CO₂インキュベータ内に静置した。

(12)以降、培地の量に注意し、毎日、1日1回の培地の交換を行った。培地の量に関しては上記(10)に記載したようにする。

【0022】これら一連の操作により、組織培養用基盤上で、ラットの大脳皮質切片を培養することができた。本実施例における組織培養用基盤の効果をみるため、絶縁基盤を、(a)ポリリジン、(b)プラズマ処理、(c)ラミニン、で処理し、実施例2の方法でラット大脳皮質切片を培養し、本実施例の組織培養用基盤上で培養した場合と、培養の簡便さ、および基盤の組織切片の培養に対する適合性を比較した。基盤に対する大脳皮質切片の適合性の指標として、大脳皮質切片の定性的な様子および、組織切片からの神経繊維の伸長度合、伸長した繊維の長さを比較した。各々について10枚の標品を用意し、培養後1週間の時点での比較を行った。

【0023】ポリリジンにより表面処理した絶縁基盤は、100μg/mlの濃度のポリリジン中に絶縁基盤を1時間浸漬し、滅菌した蒸留水でポリリジンによる細胞毒性がなくなるまで洗浄して得た。一体化複合電極のプラズマによる表面処理は、10分間行った。処理後、滅菌した蒸留水で数回洗浄して培養に備えた。ラミニンにより表面処理した一体化複合電極は、上記のようにポリリジンで処理した一体化複合電極を、1mg/mlのラミニン水溶液中に1時間浸漬し、滅菌した蒸留水で数回洗浄して得た。

【0024】ポリリジンで処理した絶縁基盤、プラズマ処理した絶縁基盤とも、大脳皮質切片は萎縮して隆起した形態をとり、安定に基盤上に定着せず、基盤から剥が

れてしまうものもあった。また、液量調整も困難であり、ポリリジン、プラズマ処理した基盤には保水効果が少ないため、培養液の液量調整が困難であり、組織切片を乾燥させてしまう恐れがあった。

【0025】残った切片で培養を続けたところ、培養3日目程度で切片全体が黒く変色してしまった。これは、切片が上記形態をとったため、切片の内部にまで十分な酸素供給ができず、切片の内部の細胞が死滅してしまったためであると考えられる。結果として、1週間培養できた標品は、ポリリジン、プラズマ処理とも0枚であった。

【0026】ラミニンで処理した絶縁基盤の結果について述べる。ラミニンは神経細胞に対して、接着および神経繊維の伸長活性を持つ細胞外マトリックス構成タンパク質として広く知られており、神経細胞の培養環境には適したものであるが、組織切片に対しては、培養初期において接着性が不安定である点は上記と同様であり、7枚の切片が剥がれてしまった。また、基盤が保水性に富んでいないために上記と同様の問題があった。残った標品で観察を続けたところ、その内の2枚については、ポリリジン、プラズマ処理と同じことが観察された。しかしながら、残りの1枚では培養4日目頃から、グリア細胞と思われる細胞が、切片周辺にみられ底面を覆い出すと同時に、切片の接着性も増し、衝撃等の影響により、切片が剥がれることはなくなった。しかしながら、顕微鏡下でより詳細に観察したところ、切片の中心部は良く底面に定着していたが、周辺部の定着は不安定であり、定着と剥離を繰り返しており、組織切片からの神経繊維伸長に対して損傷を与える原因となっていた。また、切片の中心部は、黒ずんでおり中心部の細胞には既に死滅しているものも多いようであった。1週間培養できた標品は1枚であった。神経繊維の伸長は、大脳皮質切片の白質側からまばらに起こっており、観察できた神経繊維の最長のものは、約150 μ m程度のものであり、この標品で最もよく観察された神経繊維の長さは、80 μ mから120 μ m程度のものであった。

【0027】次に、本実施例の組織培養用基盤の場合の結果について述べる。まず、今までに述べた基盤に比べての大きな違いは、切片の形態で、コラーゲン層上で切片が薄く広がり、接着性が良いことを示していた。しかしながら、培養初期においては、完全に接着しているわけではなく、切片の周辺部は定着と剥離を繰り返していた。3日目以降から、切片周辺に偏平な形態をしたグリア細胞が観察されるようになり、切片の周辺部も完全にコラーゲン層上に定着し、神経繊維の伸長が観察されるようになった。切片が薄く広がった形態をとっているため、切片内部の細胞の酸素の取り込みも良好であ

り、全標品を1週間培養できた。神経繊維の伸長は、全ての標品で、切片のほぼ全面から起こっていたが、特に切片の白質側から活発に伸びていた。全標品中最長のもので、白質側から2mmにわたって伸びていた。全ての標品で、最も良く観察された神経繊維の長さは、大脳皮質切片の皮質表層側で100 μ mから200 μ m程度で、白質側で800 μ mから1.2mm程度のものであった。この結果は、本実施例の組織培養用基盤が、組織切片の培養に対して非常に良好な環境を与えるものであることを示している。

【0028】また、他の培養基盤では、培養基盤が保水性を持っていなかったため、組織切片を乾燥させてしまう恐れが常にあり、そのため、組織切片を液相と気相の界面に置くための培地の液量調整が困難であったが、本実施例の組織培養用基盤では、培養基盤であるコラーゲン層が強い保水性を持っており、培地の量が少なくても、組織切片を乾燥から守る働きがある。その結果、組織切片を液相と気相の界面に置くための培地の液量調整が容易になった。

【0029】

【発明の効果】以上説明した通り、本発明によれば、絶縁基盤とその上に設けられたコラーゲン層からなる組織培養用基盤であるので、組織切片の培養に最適な環境を提供できる組織培養用基盤を達成できる。すなわち、コラーゲン層はコラーゲン線維が網目状に入り組んだ構造を持ち、その網目の内部に、培養液は蓄えられる。また、構成される網目構造は微細であるため、毛細管現象により、コラーゲン層の乾燥部分に絶えず、培養液が供給される。従って、組織切片を培養した際の組織の乾燥が防がれる。また、組織切片培養の際の、組織切片を気相と液相の界面に位置させるという培養条件実現のための培養液の調整が容易である。さらに、コラーゲン層の厚みを調節すれば、組織切片を絶縁基盤上に密接に位置させることが可能となる。また、コラーゲンは生体内の細胞外基質の構成要素であり、多くの組織の細胞に対して、培養時の基質への定着および細胞の伸展を促進する効果を有するので、本発明の組織培養用基盤上で組織切片を培養した場合、組織切片を基盤上へ容易に定着させることができる。また、組織切片をより生体内の環境に近い状態で培養することができる。

【0030】また、コラーゲン層の厚さが10 μ m以上300 μ m以下の範囲であるので、良好な電気記録が可能な組織培養用基盤を達成できる。したがって、本発明の組織培養用基盤は、特に脳組織切片の培養に有効であり、神経繊維の伸長に対しても良好な基盤を提供する。

フロントページの続き

(72) 発明者 光亦 忠泰
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内